

NOTA TÉCNICA

Aristóbulo López-Ávila¹ y
Diego Fernando Rincón²

ABSTRACT

Designing an airflow olfactometer for measuring medium- and small-sized insects' olfactory responses

Airflow olfactometers are used in studies orientated to detection and measuring attraction responses of insects to olfactory cues from long and medium distances. An airflow olfactometer of four ways was designed for detecting responses of medium and small size insects. In order to test the performance of the device, two experiments were carried out. The response of gravid females of the Guatemalan potato moth, *Tecia solanivora*, to odors from whole potato plants or with different organs detached, was studied. It was found that more than 60% of the moths responded positively to any of the evaluated volatiles. Some recommendations are also made respecting future studies on the behaviour of *T. solanivora*.

Key words: anaemotaxis, chemical ecology, volatile compound, host finding, olfactometry, ethology.

Recibido: enero 27 de 2006.
Aceptado: junio 24 de 2006.

1. Investigador Principal, Laboratorio de Entomología, Grupo de Manejo Integrado de Plagas, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA. e-mail: alopez@corpoica.org.co

2. Investigador Profesional Asistente, Laboratorio de Entomología, Grupo de Manejo Integrado de Plagas, Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), CORPOICA. e-mail: drincon@corpoica.org.co

Diseño de un olfatómetro de flujo de aire para medir respuestas olfativas de insectos de tamaño mediano y pequeño

RESUMEN

Los olfatómetros de flujo de aire se usan para detectar y medir respuestas de atracción de los insectos ante señales olfativas provenientes de distancias largas y medianas. Se diseñó un olfatómetro de flujo de aire de cuatro vías capaz de detectar dichas respuestas en insectos medianos y pequeños. El funcionamiento del dispositivo se probó mediante dos experimentos en los que se midió la respuesta de hembras grávidas de la Polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, a olores provenientes de plantas de papa completas o con diferentes órganos removidos. Se encontró que, en promedio, más del 60% de las polillas respondieron positivamente hacia alguno de los tratamientos evaluados. Además, se presentan recomendaciones para futuros experimentos enfocados en el estudio del comportamiento de las hembras de *T. solanivora*.

Palabras clave: Anemotaxis, ecología química, compuestos volátiles, localización de hospederos, olfactometría, etología.

INTRODUCCIÓN

LA PERCEPCIÓN MEDIANTE el olfato es un proceso de gran importancia para los insectos porque está involucrado en los patrones de comportamiento más importantes como son la alimentación, la oviposición y la búsqueda de pareja, entre otros. Específicamente, se ha enfatizado en la importancia de la percepción de determinadas sustancias volátiles provenientes de las plantas que sirven para orientación hacia los sitios de oviposición en lepidópteros monófagos y oligófagos (Ramaswamy, 1988; Renwick y Chew, 1994; Heard, 1999). El estudio de los mecanismos implicados en la localización de los diferentes recursos por parte de insectos fitófagos con algún grado de especialización es de gran importancia para entender la ecología y la evolución de las interacciones entre plantas e insectos (Ehrllich y Raven, 1964; Murlis *et al.*, 1992). Estos procesos pueden ser estudiados mediante olfatómetros, que son equipos de laboratorio diseñados para medir la capacidad de los animales para percibir diferentes aromas y sustancias dispersas en el aire.

La mayor parte de los diseños de olfatómetro empleados en ecología química se usan en entomología para estudiar las respuestas de atracción olfativa de insectos hacia diversas fuentes. Se diferencian dos tipos generales de diseño para los olfatómetros: los de flujo de aire y los

de aire estático. Los primeros se usan en estudios encaminados a la detección y medición de respuestas de atracción de insectos a señales olfativas emitidas en distancias largas y medianas, ya que permite evaluar conductas de anemotaxis desencadenadas por aromas contenidos en una corriente de aire. Por su parte, los olfatómetros de aire estático se usan para medir respuestas quimiotáctiles u olfativas a cortas distancias o en situaciones en donde las señales químicas se difunden en el espacio sin ser transportadas por una corriente de aire.

Los olfatómetros de flujo de aire requieren de un sistema que permita la circulación continua de aire dentro del dispositivo. Los diseños para este tipo de olfatómetro son muy diversos; sin embargo, pueden diferenciarse tres modelos básicos: 1) túnel de viento, 2) tubo en 'Y', y 3) de cuatro vías. El olfatómetro de túnel de viento consiste en una cámara alargada con la fuente de olor en uno de los extremos y una corriente de aire que pasa por ésta y se dirige hacia el otro extremo, en donde se ubican los insectos. Gracias a la amplitud de la cámara, este tipo de olfatómetro permite medir la atracción de insectos de amplia capacidad de vuelo hacia distintas fuentes de olor. No obstante, este dispositivo permite evaluar sólo un tratamiento a la vez, lo que complica las interpretaciones en estudios de preferencia de olores.

Los olfatómetros de tubo en 'Y' son los más comunes. En éstos, los insectos tienen la posibilidad de elegir entre aire cargado de olor (tratamiento) y aire libre de olor (control) o entre dos fuentes de olor distintas. Sin embargo, este tipo de diseño ha sido ampliamente criticado en razón a que las plumas de olor se mezclan generando turbulencia en el punto en donde se encuentran los dos brazos del olfatómetro. Adicionalmente, la zona de decisión no es lo suficientemente amplia como para garantizar una escogencia olfativa del insecto. Por este motivo, en los olfatómetros de tubo en 'Y' pueden presentarse resultados no concluyentes como consecuencia de desplazamientos erráticos o de respuestas de anemotaxis comunes hacia las dos corrientes circulantes que pueden atraer a los insectos hasta más adelante de la zona de decisión para, posteriormente, verse atrapados en el brazo equivocado. Adicionalmente, experimentos realizados con olfatómetros de tubo en 'Y', en los que se hizo circular corrientes de aire sin olores por ambos brazos, demostraron que algunas especies de insectos presentan tendencias a preferir una dirección sobre otra (Van Alphen y Jervis, 1996).

El primer diseño de un olfatómetro de flujo de aire de cuatro vías fue desarrollado por Pettersson (1970) para estudiar respuestas de áfidos a feromonas sexuales. Este tercer tipo de diseño consiste esencialmente de una cámara principal con cuatro brazos equidistantes uno del otro. El aire fluye hacia la cámara principal simultáneamente a través de los cuatro brazos, que a su vez están conectados a los respectivos recipientes que contienen los aromas que se quieren evaluar. Los insectos son ubicados en el centro de la cámara desde donde pueden elegir por la corriente más atractiva. Los olfatómetros de flujo de aire de cuatro vías no presentan las desventajas de los tubos en 'Y', puesto que la cámara principal permite una mayor extensión en el área de la zona de decisión y el sistema hipobárico que se implementa en dicha cámara para provocar el flujo de aire desde los recipientes con las fuentes de aroma hacia los brazos, succiona las mezclas de olor que se puedan presentar en el centro de la cámara. Sin embargo, el diseño de olfatómetros de flujo de aire de cuatro vías se ha aplicado en su mayoría a la construcción de dispositivos para el estudio de respuestas de

atracción de insectos pequeños y de baja o nula capacidad de vuelo como áfidos y algunos dípteros y microhimenópteros. Además, estos diseños se han utilizado para evaluar feromonas sintéticas o extractos vegetales, por lo que no permiten el estudio de fuentes de olor de tamaño considerable como plantas vivas o partes de estas (Pettersson, 1970; Vet *et al.*, 1983; Crook y Mordue, 1999).

En este trabajo se presenta un nuevo diseño de olfatómetro de flujo de aire de cuatro vías que permite evaluar la respuesta de insectos de mayor tamaño que lo que permitían diseños anteriores. Además, permite utilizar fuentes de olor de tamaño considerable como plantas vivas o partes de éstas. El dispositivo se probó mediante dos experimentos en donde se utilizaron plantas de papa criolla (*Solanum phureja*) y hembras grávidas de la Polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Este microlepidóptero, considerado una de las principales plagas del cultivo de la papa en Centroamérica y el Norte de Suramérica, presenta una relación muy estrecha con la planta de papa debido a que el tubérculo es la única fuente de alimentación conocida para sus larvas (Casados 1984; Salazar y Escalante, 1984; López-Ávila, 2000). En los dos experimentos realizados en este trabajo se encontró que más del 60% de las polillas hembra respondieron hacia alguna de las fuentes de olor evaluadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Ecología y Comportamiento de Insectos del Programa de Manejo Integrado de Plagas de CORPOICA, ubicado en el Centro de Investigación Tibaitatá. El olfatómetro se diseñó con base en modelos similares previamente descritos por Pettersson (1970), Vet *et al.* (1983) y Turlings *et al.* (2004). Se utilizó acrílico para la construcción de las cámaras y mangueras de poliuretano para la conducción del aire. Para la corriente de aire se usó la línea de alta presión del laboratorio. Los accesorios complementarios se detallan en la sección de resultados y discusión.

Evaluación del equipo

Para evaluar el equipo se diseñaron dos experimentos utilizando plantas de papa

criolla (*Solanum phureja*) y hembras grávidas de la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora*. En los experimentos se usaron plantas de papa criolla en estado de floración sembradas en materas. A estas plantas se les retiraron diferentes órganos dejando únicamente los correspondientes a cada uno de los tratamientos. En el primer experimento los cuatro tratamientos consistieron en: follaje, flores, cuatro tubérculos de papa criolla sembrados a 5 cm de profundidad en una matera y un control que consistió en una matera con tierra pero sin material vegetal. En el segundo experimento se establecieron cuatro tratamientos: una planta completa, una planta a la que se le retiró el 50% del follaje, un arrume de 10 tubérculos de papa criolla medianos, y un control que consistió en una corriente de aire libre de olores.

Los experimentos fueron realizados teniendo en cuenta las horas del día de mayor actividad de la Polilla guatemalteca (Corredor y Flórez, 2003; Torrado-León, 2004: durante las primeras horas de luz en el día (entre las 5:00 y las 8:00 horas) y durante las últimas horas de luz en la tarde (entre las 17:00 y las 19:00 horas). Cada sesión consistió en la exposición de 30 hembras grávidas de *T. solanivora* a las emanaciones volátiles provenientes de las estructuras ubicadas dentro de las cámaras colectoras del olfatómetro. Dentro del tubo dispensador se permitió un período de ambientación de los insectos de cinco minutos antes del inicio de cada sesión. Se realizaron tres repeticiones cambiando los insectos y las fuentes de olor. Se registró el número de polillas en cada sector de la cámara principal del olfatómetro cada 30 minutos.

Para el análisis estadístico se utilizaron los conteos de polillas observados en los brazos de cámara principal del olfatómetro. Se obtuvo el promedio de polillas en cada uno de los brazos que contenían los tratamientos y se efectuó un ANAVA para cada experimento. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey ($\alpha=0,01$), mientras los análisis fueron ejecutados utilizando el software R® versión 2.5.1 (2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción del equipo

El olfatómetro diseñado consta de tres componentes principales y algunos accesorios. Los componentes principales consisten en: 1) una cámara principal en donde se depositan los insectos a evaluar (Figura 1e); 2) cuatro cámaras colectoras en donde se introducen las fuentes de olor (Figura 1d); y 3) un repartidor de aire (Figura 1c). La cámara principal es un cilindro de acrílico de 10 cm de alto por 25 cm de diámetro dividido en cuatro sectores mediante tabiques semicirculares; posee cuatro brazos laterales que consisten en tubos de 30 cm de largo por 4 cm de diámetro y un tubo dispensador de insectos de 20 cm de largo por 7,6 cm de diámetro ubicado en el centro de la cámara. Este tubo tiene la facilidad de subir y bajar lo que permite que, durante el tiempo de ambientación, los insectos permanezcan confinados en la parte central de la cámara principal. Cuando el tubo dispensador se sube, este funciona como un extractor que, a manera de chimenea, extrae las mezclas de olores que se puedan presentar en el centro de la cámara principal. En el extremo distal de cada uno de los brazos de la cámara principal se instaló un tapón de caucho a través del cual entra una punta plástica para micropipeta (101-1.000 μ L Brand®) que funciona como dispensador de olores.

Cada cámara colectora (Figura 1d) consiste en un cilindro de acrílico de

50 cm de alto por 25 cm de diámetro, sellado en sus extremos superior e inferior mediante una tapa adecuada con empaques de presión para evitar cualquier escape de aire. Poseen además dos orificios circulares opuestos de 2,5 cm de diámetro, uno en la parte inferior y el otro en la parte superior. El repartidor de aire (Figura 1c) es un cubo hueco de hierro de 3 cm de lado, con un agujero de entrada en la parte superior y cuatro de salida ubicados en cada una de las caras laterales, y equidistantes del agujero de entrada para asegurar una distribución equitativa del aire; el repartidor de aire se fija con tornillo sobre un trípode. Esto permite su ubicación central y equidistante respecto a las fuentes de olor. Para el transporte de las corrientes de aire, se utilizaron mangueras de poliuretano de 10 mm de diámetro en el trayecto entre la toma de aire del compresor y el repartidor y de 8 mm de diámetro entre las salidas del repartidor de aire y los agujeros inferiores de las cámaras colectoras, así como entre las cámaras colectoras y los respectivos brazos de la cámara principal.

Adicionalmente, el olfatómetro consta de tres componentes accesorios en el recorrido entre la toma de aire y el repartidor de aire así: un manómetro con regulador de flujo, un filtro de carbón activado y una trampa de agua.

Funcionamiento del equipo

El aire proveniente del compresor pasa inicialmente por el filtro de carbón acti-

vado (Figura 1a) que remueve cualquier olor o impureza, luego pasa por la trampa de agua (Figura 1b) que le restituye la humedad. Posteriormente, el flujo de aire ingresa al repartidor (Figura 1c) el cual distribuye equitativamente la corriente hacia las cuatro mangueras neumáticas que conectan por la parte inferior con las cuatro cámaras colectoras (Figura 1d). En estas cámaras el aire se mezcla con las emanaciones volátiles emitidas por las respectivas fuentes de olor y sale por la parte superior hacia los brazos de la cámara principal (Figura 1e).

El ingreso de flujo hacia los brazos de la cámara principal se da por medio de los dispensadores de olores, las cuales generan corrientes delgadas de aire (plumas) y evitan que los insectos pasen a través de las mangueras. Las corrientes de aire mezcladas con los respectivos olores, son dirigidas por los surcos conformados por los tabiques semicirculares hasta la parte central de la cámara principal. La disposición de estos tabiques evita que las corrientes de aire se dispersen dentro de la cámara permitiendo la conformación de un gradiente de concentración de volátiles proveniente de cada uno de los dispensadores de olores.

Los insectos a evaluar se depositan en la parte central de la cámara principal mediante el tubo dispensador que debe estar introducido hasta el fondo de la cámara durante el período de ambientación de los insectos. Una vez se levanta el tubo dispensador para iniciar el experimento, los insectos tienen la posibilidad de elegir el brazo de la cámara de donde proviene el olor más atractivo. Gracias a la forma, ubicación y facilidad para subir y bajar el tubo dispensador de insectos, éste sirve además como chimenea para permitir la salida del aire de la parte central de la cámara principal y evitar la mezcla de los olores provenientes de los tratamientos. Con el fin de facilitar el reporte de la ubicación de los insectos dentro de la cámara principal del olfatómetro, cada brazo fue dividido en cuatro sectores (L1, L2, L3 y L4). El primero, L1, corresponde al surco de la cámara principal formado por los tabiques anterior al ingreso de cada tubo, L2 corresponde al primer segmento del tubo, L3 al intermedio, y el cuarto, L4, al sector más próximo al dispensador de olores (Figura 1e).

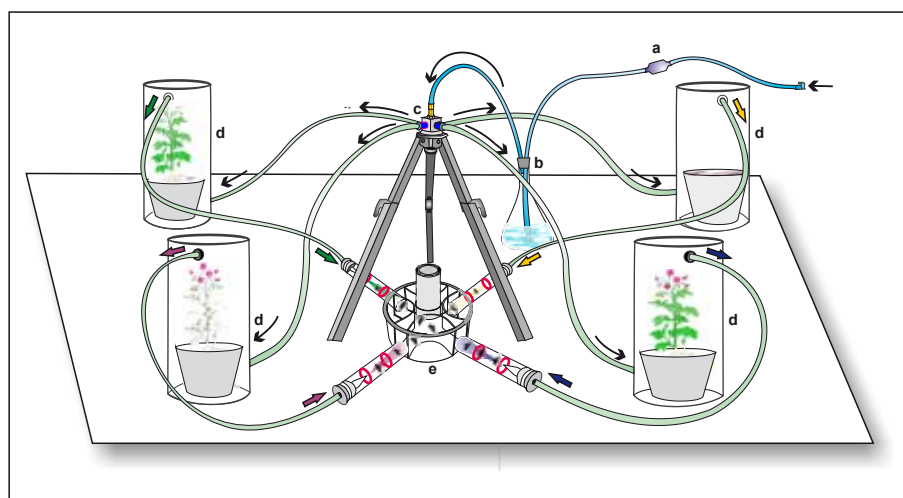


Figura 1. Ilustración del olfatómetro de flujo de aire de cuatro vías: a) línea de alta presión de aire (compresor) y filtro de carbón activado; b) trampa de agua; c) repartidor; d) cámaras colectoras; e) cámara principal. Las flechas indican el recorrido del aire (dibujo digital por C. Pinto).

Evaluación del equipo

Los resultados de los dos experimentos mostraron que el olfatómetro permitió detectar la respuesta de atracción de las hembras grávidas de *Tecia solanivora* hacia los diferentes tratamientos evaluados.

En el primer experimento se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 11,02$; $gl= 3$; $P<0,001$). En efecto, una menor cantidad de polillas eligieron la corriente de aire que contenía los volátiles emitidos por los tubérculos, mientras que no se encontraron diferencias entre el resto de los tratamientos (Tabla 1). En este experimento, las polillas que eligieron alguno de los tratamientos evaluados correspondieron al 60,63% del total de polillas evaluadas.

En el segundo experimento se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 10,79$; $gl= 3$; $P<0,001$). Los tratamientos correspondientes a plantas completas y plantas cortadas mostraron medias significativamente mayores que aquellos correspondientes a tubérculos y control (Tabla 2). En este experimento, en promedio, un 64,46% de las polillas respondieron hacia alguno de los tratamientos evaluados.

Los experimentos realizados demuestran la eficacia del olfatómetro diseñado en la detección de respuestas olfativas en microlepidópteros. Esto se evidencia en el porcentaje de polillas que respondieron hacia los tratamientos. Por otra parte, pese

a que se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, no es posible sacar conclusiones definitivas con respecto al comportamiento de las hembras de *T. solanivora* frente a los volátiles emitidos por la planta de papa. Sin embargo, los resultados dilucidan tendencias como la influencia de las sustancias volátiles emitidas a consecuencia del daño físico y la atracción hacia las plantas que mantuvieron la proporción natural de sus órganos, que pueden tenerse en cuenta para futuros experimentos encaminados comprender el comportamiento de oviposición de *T. solanivora*.

Se recomienda realizar experimentos con fuentes de olor de eficacia comprobada en la atracción de insectos (tipo feromonas sexuales sintéticas), a fin de detectar posibles errores en los procedimientos realizados, ya que es necesario señalar que la metodología utilizada es novedosa y que pueden existir factores relacionados con el manejo de los insectos o con el diseño del olfatómetro que hayan provocado un incremento en la variabilidad no explicada de los experimentos.

CONCLUSIONES

El olfatómetro presentado permite detectar y evaluar respuestas olfativas de microlepidópteros como *Tecia solanivora*, ya que el diseño se ajusta al tamaño y capacidad de vuelo de estos insectos. Así mismo se espera que el olfatóme-

tro funcione en igual forma con otros insectos de tamaños medianos como las demás especies de polillas de la papa o más pequeños como microhimenópteros parasitoides. Este diseño de olfatómetro permite la evaluación de fuentes de olor de mayor tamaño que las que se utilizan en los olfátómetros convencionales, como plantas completas o partes de éstas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al diseñador gráfico Carlos Pinto por su ayuda en la elaboración de la ilustración de olfatómetro de flujo de aire. A los profesores Evaldo Vilela, de la Universidad Federal de Viçosa (Brasil), y a Giovanny Fagua, de la Pontificia Universidad Javeriana, y al grupo de investigación en entomología del Centro de Investigación Tibaitatá de CORPOICA.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Casados, J. 1984. Estudio del ciclo biológico de la Polilla o Palomilla guatemalteca de la papa (*Scrobipalopsis solanivora* Povolny) en Chimaltenango, Guatemala. Tesis Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Chimaltenango (Guatemala). 37 p.
- Crook, D. y A. Mordue. 1999. Olfactory responses and sensilla morphology of the Blackcurrant leaf midge *Dasineura tetensi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 37-50.
- Corredor, D. y E. Flórez. 2003. Estudios básicos de biología y comportamiento de la Polilla guatemalteca de la papa en un área piloto del municipio de Villapinzón. En: *Memorias Tecia solanivora*, II Taller Nacional "Presente y futuro de la investigación en Colombia sobre Polilla guatemalteca". CEVIPAPA, CNP, ANDI, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá (Colombia).
- Ährlich, P. y P. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Heard, T. 1999. Concepts in insect host-plant selection behavior and their application to host specificity testing. En: Spencer, N. (ed.). *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*. Julio 4-14. Bozeman, Montana (EEUU). pp. 2-8.
- López-Ávila, A. 2000. Insectos plaga del cultivo de la papa en Colombia y su manejo. *Papas Colombianas 2000*, con el mejor entorno ambiental. 25 años FEDEPAPA. Ventana al Campo Andino 3 (1-2): 152-159.

Tabla 1. Resultados del experimento 1 en el que se evaluaron partes de plantas de papa criolla sembradas en materas.

Tratamiento	Promedio de polillas en los sectores L3 y L4*
Plantas con follaje	4,61a
Plantas con flores	5,45a
Tubérculos	3,37b
Control	4,76a

*Promedios seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. ($\alpha= 0,01$; $P<0,001$).

Tabla 2. Resultados del experimento 2 en el que se evaluaron plantas de papa criolla sembradas en materas para establecer el efecto del corte de los órganos.

Tratamiento	Promedio de polillas en los sectores L3 y L4*
Planta completa	5,14a
Planta con cortes	6,11a
Tubérculos	3,52b
Control	3,37b

*Promedios seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas. ($\alpha= 0,01$; $P<0,001$).

- Murlis, J., J. Elkinton y R. Cardé. 1992. Odor plumes and how insects use them. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 505-532.
- Pettersson, J. 1970. An aphid sex attractant. I. Biological studies. *Entomol. Scandinavica* 1: 63-73.
- RDevelopment Core Team. 2006. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. En: <http://www.R-project.org>; consulta: enero 2006.
- Ramaswamy, S. 1988. Host finding by moths: sensory modalities and behaviours. *J. Insect Physiol.* 34 (3): 235-249.
- Renwick, J. y F. Chew. 1994. Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 377-400.
- Salazar, J., y W. Escalante. 1984. La polilla guatemalteca de la papa *Scrobipalopsis solanivora*, nueva plaga del cultivo de la papa en Venezuela. En: XI Jornadas Agronómicas. Resúmenes. Maracaibo (Venezuela), pp. 24-28.
- Torrado-León, E. 2004. Comportamiento de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). Memorias XXXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN). Julio 28-30 de 2004, Bogotá D.C. (Colombia).
- Turlings, T., A. Davison y C. Tamó. 2004. A six-arm olfactometer permitting simultaneous observation of insect attraction and odour trapping. *Physiol. Entomol.* 29(1): 45-55.
- Van Alphen, J. y M.A. Jervis. 1996. Foraging behaviour. pp. 1-62. En: Jervis, M. y N. Kidd (eds.). *Insect natural enemies: practical approaches to their study and evaluation*. Chapman and Hall, Londres (Inglaterra).
- Vet, L., J. Van Lenteren, M. Heymans y E. Meelis. 1983. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiol. Entomol.* 8: 97-106.